

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt
Kierunek: Biologia
Jednolite stacjonarne studia magisterskie
Specjalność: Biologia stosowana

Łukasz Majka
Nr albumu 75289

**Charakterystyka polimorfizmu *locus*
DRB1 MHC klasy II zajęcy (*Lepus
europaeus* P.)**

Characteristic of polymorphism *locus* DRB1 of the
hares (*Lepus europaeus* P.) MHC class II

Praca magisterska napisana
pod kierunkiem
prof. dr hab. Barbary Kosowskiej
w Pracowni Biologii Molekularnej
i Cytogenetyki, Katedry Genetyki
i Ogólnej Hodowli Zwierząt

Wrocław, 2010

Chciałbym złożyć serdeczne podziękowania
Pani prof. dr hab. Barbarze Kosowskiej za okazaną pomoc,
życzliwość i cierpliwość przy pisaniu niniejszej pracy.

Podziękowania składam także Panu dr Tomaszowi Strzale
za pomoc i wsparcie w przygotowaniu niniejszej pracy.

Oświadczenie opiekuna pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie tytułu zawodowego.

Data

Podpis opiekuna pracy.....

Oświadczenie autora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca dyplomowa została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami ani też nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem tytułu zawodowego w wyższej uczelni.

Data

Podpis autora pracy.....

Streszczenie

Charakterystyka polimorfizmu *locus* DRB1 MHC klasy II zajęcy (*Lepus europaeus* P.)

W niniejszej pracy dokonano charakterystyki genetycznej polskiej populacji zająca szaraka (*Lepus europaeus* P.) na podstawie polimorfizmu exonu 2 genu DRB1 MHC klasy II. Z próbek pozyskanych od 54 zajęcy pochodzących z 11 regionów Polski wyizolowano DNA, z którego techniką PCR amplifikowano 2 eksony genu DRB1. Profil genetyczny produktów PCR ustalono za pomocą techniki SSCP, dzięki czemu uzyskano 12 alleli tworzących 15 haplotypów. Wykazano brak zmienności genetycznej pomiędzy zającami bytującymi w badanych regionach, co przełożyło się na niewielką wartość dystansu genetycznego. Ponadto stwierdzono w 3 z 11 badanych regionalnych populacji niższy poziom heterozygotyczności obserwowanej w porównaniu z oczekiwaną oraz ogólnie wysoki poziom różnorodności genetycznej w całej badanej populacji zająca szaraka.

Słowa kluczowe: DRB1, MHC, SSCP, PCR, zając szarak, zmienność genetyczna

Abstract

Characteristic of polymorphism *locus* DRB1 of the hares (*Lepus europaeus* P.) MHC class II

In this paper was studied genetic characteristics of the Polish population of brown hare (*Lepus europaeus* P.) on the basis of the polymorphism exon 2 gene DRB1 MHC class II. The samples obtained from 54 hares coming from 11 Polish regions of DNA isolated from the PCR amplified exon 2 of DRB1 gene. Genetic profile of PCR products was found by SSCP technique which allows to have 12 alleles forming 15 haplotypes. It has been shown no genetic variation among hares in the test regions, leading to the small value of genetic distance. It was also found in 3 out of 11 regional population lower observed heterozygosity compared with the expected and generally high level of genetic diversity in the overall study population of brown hare.

Key words: DRB1, MHC, SSCP, PCR, brown hare, genetic variability

Spis treści:

1. Wstęp.....	7
2. Materiał i metody.....	12
3. Wyniki.....	16
4. Dyskusja.....	21
5. Podsumowanie.....	24
6. Wnioski.....	25
7. Piśmiennictwo.....	26

Wstęp

Zając szarak (*Lepus europaeus* Pallas) należy do rodzaju *Lepus*, rodziny *Leporidae* oraz rzędu *Lagomorpha*. Jest gatunkiem stepowym. Zamieszkuje obecnie całą Europę, z wyjątkiem Norwegii oraz północnych części Szwecji, Finlandii i Rosji. W Azji granica zasięgu tego gatunku dochodzi na wschodzie do rzeki Ob.

W Polsce zając występuje wszędzie w bardzo różnym zagęszczeniu (Flux i Angermann, 1990). Przedstawiciele tego gatunku odznaczają się wielkimi zdolnościami dostosowywania się do różnych warunków środowiskowych. Oprócz odpowiadających mu najbardziej terenów polnych, zamieszkuje lasy, bagna, wydmy nadmorskie, torfowiska oraz obszary rekultywowane. W przypadku lasów zasiedla on przede wszystkim ich obrzeża oraz mniejsze kompleksy. W głębi większych lasów spotyka się go znacznie rzadziej (Homolka i Zima, 1999). Wraz ze zwiększającą się wysokością terenu nad poziomem morza liczebność zające się zmniejsza. Nie ma go więc w skalistych najwyższych partiach Tatr. Zające mogą osiągnąć dojrzałość płciową już w pierwszym roku życia. Minimalny okres niezbędny do osiągnięcia tej dojrzałości i przystąpienia do rozrodu wynosi u samic 7 miesięcy, u samców zaś 5-6 miesięcy. Zając przez 10 miesięcy w roku wykazuje fizjologiczną zdolność do rozmnażania się.

Od ponad 18 lat notuje się wyraźny spadek liczebności zające na terenie Polski. Obserwacje wyników polowań wskazują, iż tendencja spadkowa populacji zające w Europie rozpoczęła się już w latach 60. w Polsce (Pielowski i Raczyński, 1976), Wielkiej Brytanii (Tapper i Parsons, 1984) w Danii (Strandgaard i Asferg, 1980), w Szwajcarii (Salzmann-Wandeler, 1976) oraz Rumunii (Almasan i Cazacu, 1976). Według informacji wykr. Polskiego Związku Łowieckiego, w 2007 roku populacja zająca szaraka na terenie Polski liczyła 498.669 osobników. Najwięcej zające notowano na terenie województwa Mazowieckiego w liczbie 92.132 osobników. Natomiast najmniej zające obserwowano w województwie opolskim, bowiem odnotowano ich jedynie 6397 osobników. W badaniach Pielowskiego (1975) ustalono, iż śmiertelność zające wynosi ok. 20 % w okresie rozrodu i 5% w okresie zimowym. Wysoki jest też zazwyczaj ubytek młodych zające od momentu urodzenia do okresu jesienno. Ginie około 4 na 5 osobników urodzonych w danym roku. Do tej pory nie ustalono jednej przyczyny odpowiedzialnej za spadek liczebności tych zwierząt. Badania prowadzone

przez Pielowskiego (1975) wyróżniły następujące główne czynniki będące przyczynami zwiększonej śmiertelności zajęcy: choroby (ponad 26%), rolnictwo w tym: agrotechnika - 17 i chemizacja - 15,1%, drapieżniki 16 % (w tym lisy – 11%), pozyskanie łowieckie – 8%. Inne czynniki mają mniejsze znaczenie, lecz również przyczyniają się do zwiększenia śmiertelności. Są to: warunki pogodowe i komunikacja kołowa. Trudnym do oceny czynnikiem jest kłusownictwo, ponieważ dostępne informacje są niedokładne i opierają się na nieoficjalnych przesłankach. Do tej pory brak jest jednoznacznych dowodów na to, że skażenie terenu substancjami toksycznymi (insektycydy, herbicydy) jest bezpośrednią przyczyną zmniejszenia populacji zajęcy. Całkiem prawdopodobne, że metale ciężkie upośledzają układ odpornościowy i uszkodzają układ rozrodczy zajęcy. Szczególnie niebezpieczne są związki fosforoorganiczne, bardzo często stosowane w rolnictwie (Dziedzic i wsp., 2000). Niektóre źródła wskazują również na zgubne działanie herbicydu Parakwat, tj. dichlorku 1,1'-dimetylo-4,4'-bipirydyniowego, który stosowany był na masową skalę jako wyjątkowo skuteczny herbicyd od 1961 roku i oficjalnie został wycofany z użycia w roku 2007 z krajów Unii Europejskiej ze względu na niską selektywność (Judgment of the Court of First Instance in Case T-229/04, 2007).

Warto także wspomnieć, iż zajęc szarak został uznany za gatunek wskaźnikowy dla zmian środowiska. Zdolność do bycia bioindykatorem środowiska została potwierdzona przez licznych europejskich badaczy (Pfister i wsp., 2002; Nyenhuis, 1998). Rozważa się również udział tak zwanej „choroby pachwinowej” która miałaby być przyczyną gwałtownego wymierania zajęcy (Dziedzic i wsp., 2000). Do tej pory nie ustalono etiologii i etiopatogenezy powyższego schorzenia, które objawia się pęknięciami skóry w okolicach zajęczych pachwin (Nowotny i wsp. 1997). Spośród chorób zakaźnych zajęcy takich jak kokcydioza, robaczycy przewodu pokarmowego, pseudogruźlica, pasteureloza, staphylokokkoza, bruceloza, największe znaczenie przypisuje się „Zespołowi Zająca Szaraka” – EBHS (zwanej także pomorem zajęcy), chorobie wywoływanej przez wirus z rodziny Caliciviridae z rodzaju Lagovirus (Capucci i wsp., 1991). Ustalono, że wirus EBHS replikuje się w komórkach królików, co jest dowodem przełamania przez ten wirus bariery gatunkowej. Wykazano także nietypowe objawy chorobowe u królików oraz mniejszą śmiertelność zainfekowanych królików niż zajęcy (Nowaczyk i wsp. 2007). Podjęto także prace nad profilaktyką zajęcy z hodowli klatkowej w celu uniknięcia zakażenia w warunkach hodowlanych lub

po wypuszczeniu do środowiska naturalnego. Należy wspomnieć, że wiele zajęcy po wypuszczeniu na wolność ginie.

W Polsce z 3 milionów zajęcy w latach siedemdziesiątych, do 2001 roku zostało około 450 tysięcy osobników (Dziedzic i wsp., 2000). W związku ze stale spadającą liczebnością zajęcy w Polsce, w 2004 r. pojawiły się głosy o objęcie tego gatunku ochroną gatunkową. Zając szarak w ostatnich latach został także dołączony do załącznika III Konwencji Bernańskiej, a w takich krajach jak Norwegia, Niemcy, Austria i Szwajcaria został wpisany do Czerwonej Księgi jako gatunek „bliski zagrożenia” lub „zagrożony” (Reichlin i wsp., 2006). Okres ochronny zająca szaraka obowiązuje od 10 października do 15 stycznia.

W ramach grantu rozwojowego nr R/12/07003, pt. „Ochrona ginącego gatunku w Polsce na przykładzie zająca szaraka” finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, zbudowano w Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu, woliere hodowlaną dla zajęcy oraz odłowiono dzikie zające i zasiedlono nimi woliere.

Jednym z najważniejszych warunków, które muszą być spełnione, aby populacja przetrwała, jest zachowanie jej różnorodności genetycznej. Należy w tym celu przeprowadzić badania umożliwiające charakterystykę genetyczną gatunku, w tym ocenę zasobów różnorodności genetycznej. Badania prowadzone w latach 90. i 80., z konieczności koncentrowały się jedynie na cechach morfologicznych (Halanych i wsp., 1999; Chapman i Flux, 1990; Angermann, 1983). Charakterystyka genetyczna osobników badanego gatunku umożliwia ich zróżnicowanie i szacowanie wskaźników zmienności genetycznej, a te z kolei pozwalają na badanie zasobów zmienności genetycznej, struktury genetycznej populacji a więc mierzenie potencjału genetycznego, jaki tkwi wewnątrz gatunku. Potencjał ten często decyduje o przetrwaniu gatunku w chwilach zagrożenia jego egzystencji (epidemie, głód, klęski żywiołowe). Do badań wybiera się z reguły najbardziej zmienne *loci* DNA obecne u przedstawicieli badanego gatunku, najczęściej w postaci wysoko polimorficznych rejonów mitochondrialnego DNA oraz wybranych polimorficznych *loci* jądrowego DNA.

Badania struktury genetycznej zajęcy w różnych krajach Europy prowadziło dotychczas wielu badaczy (Djan i wsp., 2006; Sert i wsp., 2005; Mamuris i wsp., 2001; Vapa i wsp., 2002; Suchentrunk i wsp., 2003)

W Polsce badania genetyczne w oparciu o mitochondrialny DNA, zapoczątkował na dużej populacji dziko żyjących zajęcy Strzała i wsp., (2008). Badacze ci wybrali do analiz genetycznych najbardziej zmienne regiony mitochondrialnego DNA,

które analizowali metodą RFLP, z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych. Genom mitochondrialny posiada jednak liczne ograniczenia, które nie pozwalają na wysnuwanie z badań daleko idących wniosków. Dużo bardziej wiarygodne wyniki dają badania genomu jądrowego. Najbardziej zmienne *loci* genomu jądrowego ssaka znajdują się w obszarze haplotypu głównego układu zgodności tkankowej (MHC). MHC (Major Histocompatibility Complex), stanowi zespół genów, które kodują cząsteczki glikoprotein zwane antygenami zgodności tkankowej. Najważniejszą funkcją cząsteczek MHC jest wiązanie i prezentacja antygenów obcych oraz własnych zmienionych, własnym immunokompetentnym limfocytom T. Geny MHC dzielą się na klasy, kodujące dwa rodzaje cząsteczek. Cząsteczki MHC klasy I prezentują antygeny, które zostały zsyntezowane wewnątrz komórki np. białka wirusów. Fragmenty antygenów prezentowane przez cząsteczki MHC klasy I na powierzchni błony komórkowej, stają się miejscem przyczepu limfocytów Tc. Te z kolei zabijają komórkę wraz z antygenem, co jest odpowiedzią immunologiczną typu komórkowego (Jakóbisiak i Płoski, 2007).

Cząsteczki klasy II prezentują nieswoiste antygeny np. bakterie, które wniknęły do wnętrza komórki z otaczającego ją środowiska. Antygeny te są cięte na fragmenty w endosomach i prezentowane na powierzchni komórek. Kompleksy cząsteczka MHC i antygen są rozpoznawane przez limfocyty Th. Te starają się pobudzić limfocyty B do produkcji przeciwciał. Tak rozwija się odpowiedź immunologiczna typu humoralnego.

Region genów MHC klasy II (odpowiedzialny za kodowanie cząsteczek MHC klasy II) u ssaków łożyskowych dzieli się na 6 różnych klas *loci*. Są to klasy DP, DM, DO, DN, DQ i DR. Każda z wymienionych grup charakteryzuje się znacznym i zarazem odmiennym stopniem polimorfizmu genów wchodzących w ich skład.

Wszystkie haplotypy DR zawierają pojedyncze geny DRA oraz różną liczbę genów DRB funkcjonalnych oraz pseudogenów. Każdy haplotyp DR posiada wysoko polimorficzny *locus* DRB1. W układzie HLA istnieje 9 *loci* genu DRB oznaczonego od DRB1-DRB9. Cztery z nich są funkcjonalne (-DRB1, -DRB3, -DRB4, i -DRB5), a 5 jest pseudogenami (-DRB2, -DRB6, -DRB7, -DRB8, i -DRB9) (Bergström, 1999).

Locus DRB1 został zmapowany w chromosomie 6, w krótkim ramieniu p w prążku 21.3 z dokładnym umiejscowieniem od 32654525 do 32665540 pz (Dessen i Le Minor, 2010) Znaczny polimorfizm DRB1 pozwala na ustalanie dokładnych relacji ewolucyjnych pomiędzy ssakami łożyskowymi. Dla przykładu jeden z alleli tego genu

wywodzący się z linii allelicznej DRB1*08 powstał około 20.000 lat temu (Titus-Trachtenberg, 1994)

Allele HLA-DRB1 będąc efektem mutacji w najbardziej gorących miejscach genomu ssaka, kodują unikalną sekwencję aminokwasów tworzących tzw. łańcuch beta 1 DR znajdujący się w rowku cząsteczki MHC klasy II (Qian i wsp. 2008). Jest to miejsce strategiczne, którego polimorfizm pozwala na łączenie się z wieloma typami antygenów. Liczba nieswoistych antygenów mogących związać się z cząsteczką MHC zależy od tego, czy rowek danej cząsteczki może jeszcze pomieścić jakiś antygen. Rowek to przestrzeń pomiędzy szczególnymi łańcuchami polipeptydowymi tworzącymi cząsteczkę MHC. Brak odpowiedzi immunologicznej na dany antygen jest nie tylko spowodowane brakiem odpowiednich limfocytów, ale także brakiem odpowiednich cząsteczek MHC, które ten antygen prezentują. Heterozygoty lepiej prezentują antygeny, ponieważ posiadają bogatszy zakres form cząsteczek MHC mogących wiązać się z wieloma różnymi antygenami. Udowodniono, że w populacjach izolowanych także ludzkich, faworyzowane są osobniki heterozygotyczne pod względem haplotypu MHC (Jakóbisiak i Płoski, 2007). Zachowanie różnorodności genetycznej w tym regionie jest warunkiem, aby populacja określonego gatunku ssaków przetrwała.

Celem niniejszej pracy jest charakterystyka genetyczna zająca szaraka, która będzie dokonana w oparciu o jedno z najbardziej polimorficznych *loci* ustroju ssaka: ekson 2 genu DRB1 MHC klasy II.. Tak zmienna sekwencja pozwoli dobrze zróżnicować wybraną do badań populację zająca polskich, a uzyskane wyniki odnieść do znanych już sekwencji tego *locus* u zająca z innych regionów Europy.

Material i metody

Materiałem w niniejszej pracy były próbki różnych tkanek pochodzących od zajęcy odłowionych przez myśliwych z Polskiego Związku Łowieckiego z różnych obszarów Polski (rys.1). Próby przechowywano w temperaturze -20 stopni Celsjusza aż do rozpoczęcia protokołu izolacji.



Rys. 1. Liczba i rozmieszczenie pozyskanych prób na terenie Polski.

Jądrowy DNA z krwi uzyskano za pomocą zestawu do izolacji DNA Blood Mini firmy A&A Biotechnology. Zestaw przeznaczony jest do izolacji DNA z 0,1 – 1 ml krwi świeżej, 0,1 ml krwi mrożonej oraz śladów krwi. Krew była lizowana w odpowiednim buforze lizującym, zawierającym sole chaotropowe i detergenty niejonowe (bufor LT). Dodatkowym czynnikiem lizującym była silna proteaza (Proteinaza K). W powstałych warunkach dochodziło do lizy komórek i degradacji wszelkich białek. Tak powstała mieszanina została przeniesiona na minikolumnę ze

złożem krzemionkowym. DNA przechodząc przez to złożenie wiąże się z nim. Natomiast zanieczyszczenia po wypłukaniu gromadzą się na dnie minikolumny. DNA związane z podłożem krzemionkowym wypłukiwano niskojonowymi buforami. Tak uzyskane DNA nadawało się do następnych badań bez konieczności precypitacji.

Pełny protokół izolacji dostępny jest pod adresem producenta:

http://www.aabiot.com/products/dna_purification/genomic_dna/blood_mini/protocol_blood_mini.pdf

Dodatkowo stosowano zestaw Genomic Mini AX Blood tej samej firmy, który w izolacji DNA nie wymagał wirowania próbek. Rozdzielenie DNA od zanieczyszczeń odbywało się w kolumnach za pomocą sił ciężenia. Szybkość przepływu przez kolumnę zależała od ilości oraz wielkości cząstek DNA. Niestety duża ilość DNA i zanieczyszczeń powodowała znacznie spowolnienie przepływu, a w niektórych przypadkach aż do zablokowania kolumny. Ze względu na brak rotora do wirowania zablokowanych kolumn, używano metod w oparciu o podciśnienie (vacuum). Zaletą powyższego zestawu jest to, że izolację procesu oczyszczania DNA można przerwać w każdym momencie i kontynuować nawet po upływie 15 godzin, co nie wpływa na jakość DNA.

Pełny protokół izolacji dostępny jest pod adresem producenta:

http://www.aabiot.com/products/dna_purification/genomic_dna/genomic_mini_ax_blood/protocol_genomic_mini_ax_blood.pdf

Jądrowy DNA z tkanek stałych uzyskano za pomocą zestawu do izolacji Sherlock AX firmy A&A Biotechnology. Tkanki przed użyciem roztworów lizujących były mechanicznie rozdrobnione. Zestaw opiera się o wykorzystanie unikalnych membran jonowo-wymiennych wiążących DNA. Po lizie, próby były filtrowane w celu oddzielenia zanieczyszczeń, a następnie nanoszone na kolumny z membranami jonowo-wymiennymi. Skuteczność takich membran w wyłapywaniu DNA wynosi około 99%, większość zanieczyszczeń przechodzi przez membranę. Do wypłukiwania resztek zanieczyszczeń z membrany użyto roztworu soli o wysokiej sile jonowej. Kolejnym krokiem było odsalanie DNA oraz zagęszczanie poprzez precypitację alkoholową wzmocnioną niebieskim wzmocniaczem precypitacji. Tak uzyskany DNA został zawieszony w dowolnej ilości buforu i był gotowy do dalszych badań.

Pełny protokół izolacji dostępny jest pod adresem producenta:

http://www.aabiot.com/products/dna_purification/genomic_dna/sherlock_ax/protocol_sherlock_ax.pdf

Dzięki metodzie PCR amplifikowano 2 exon locus DRB1. Próbkę zawierającą produkt PCR oraz wyizolowany DNA były poddane próbie weryfikacyjnej za pomocą elektroforezy pod napięciem 120V w 0,5 % żelu agarozowym (dla produktów PCR) i w 1 % żelu agarozowym (dla wyizolowanych prób DNA) w celu potwierdzenia obecności uzyskanego materiału służącego do dalszych bardziej złożonych procedur.

Do ustalenia polimorfizmu exonu 2 locus DRB1 użyto połączenia techniki PCR- SSCP (Polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism). Jest to prosta i dokładna metoda w określaniu różnic pomiędzy możliwie najkrótszymi fragmentami DNA (150-300bp) (Orita i wsp., 1989). SSCP polega na wykorzystaniu różnic w migracji krótkich jednoniciowych odcinków DNA w żelu poliakryloamidowym determinowanych przez konformację przestrzenną (strukturę trzeciorzędową DNA) poszczególnych nici. Wystarczy jedna zmiana zasady wchodzącej w skład nukleotydu, aby cały fragment DNA przybrał inne ustawienie konformacyjne. Jest to spowodowane zmianą równowagi termodynamicznej wiązań wodorowych między komplementarnymi parami nukleotydów oraz między łańcuchami DNA, a ruchami Browna nukleotydów (Nowak i Gruszczyńska, 2007).

W niniejszej pracy udało się uzyskać 42 próby zawierające amplifikowany exon 2 locus DRB1. Tak uzyskany produkt PCR (2ul dla każdej próby; większe objętości produktu PCR powodowały szybszą renaturyzację DNA i przechodzenie w cząsteczki dwuniciowe) został poddany denaturacji termicznej w obecności loadera SSCP w temperaturze 90 stopni Celsjusza przez czas 20 minut, a następnie wyjęty 1 minutę przed końcem denaturacji i schłodzony w lodzie (szok termiczny zapobiega renaturyzacji DNA). Kolejnym krokiem było naniesienie prób do wcześniej przygotowanego 38,5% żelu poliakryloamidowego. Przygotowane żele zostały następnie poddane rozdzielowi elektroforetycznemu w temperaturze nieprzekraczającej 20 stopni Celsjusza (przy wyższej temperaturze konformery są niestabilne, a prążki nie wyraźne) (Okolo 10-15 stopni Celsjusza) w czasie okolo 24 godzin pod napięciem 160V. W tym czasie tworzyły się w żelu konformery pojedynczych nici DNA (dodany do każdej próby glicerol zwiększał skuteczność tworzenia się konformerów). Konformery są takimi samymi pod względem długości i sekwencji pojedynczymi pasmami DNA charakteryzującymi się taką samą ruchliwością elektroforetyczną. Żel wybarwiano za pomocą azotanu srebra (Nowak i Gruszczyńska, 2007).

W badaniach własnych użyto metody PCR-SSCP, która została zmodyfikowana przez Oritę i wsp. (1989). W niniejszej pracy nie stosowano

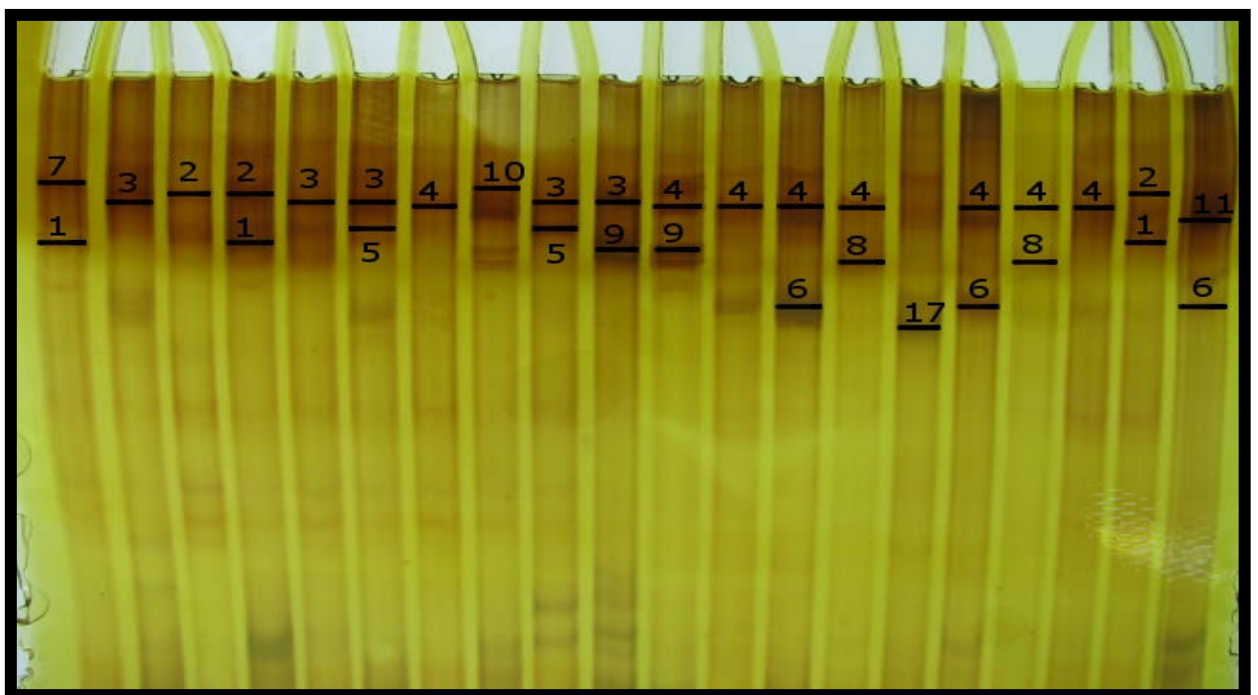
znakowania radioaktywnego, a prążki w żelu poliakryloamidowym uwidaczniano za pomocą wspomnianego azotanu srebra.

Przy pomocy programu komputerowego Arlequin (Schneider, 2006) przeprowadzono 3 testy statystyczne mające na celu scharakteryzowanie struktury genetycznej badanych zajęcy. Był to test analizy molekularnej AMOVA (statystyka F), test Hardy'ego-Weinberga oraz test macierzy odległości genetycznych F_{ST} .

Wyniki

Przebadano łącznie próby pozyskane od 54 zajęcy pochodzących z 11 różnych regionów Polski. Największe liczebnie próby stanowiły populacje zajęcy z okolic Ciechanowa – 12 osobników, Kalisza - 13, Torunia – 13 i Oświęcimia – 7.

Na podstawie metody PCR-SSCP określono polimorfizm eksonu 2 genu DRB1 klasy II MHC zajęcy i w efekcie zidentyfikowano w próbach 12 alleli genu tworzących 15 haplotypów (fot.1). Liczbę osobników heterozygotycznych określono na 32, natomiast homozygotycznych na 22 (tab.1).



Fot.1. Zdjęcie zbiorczego żelu poliakryloamidowego z oznaczonymi wszystkimi 12 allelami zidentyfikowanymi w przebadanych próbach

Tabela 1. Liczba alleli, haplotypów, heterozygot i homozygot zidentyfikowanych w badanych regionach.

Miasto	Liczba osobników	Liczba alleli	Liczba haplotypów	Liczba heterozygot	Liczba homozygot
Białystok	1	2	1	1	0
Chełm	1	2	1	1	0
Ciechanów	12	9	9	7	5
Kalisz	13	7	9	6	8
Konin	1	2	1	1	0
Łomża	2	2	2	1	1
Oświęcim	7	7	6	4	3
Świebodzin	1	2	1	1	0
Toruń	13	5	8	7	5
Zamość	1	2	1	1	0
Karkonosze	2	4	2	2	0
ogółem	54			32	22

Średnią wartość wskaźnika zmienności V , która jest wyznaczana stosunkiem procentowym wszystkich uzyskanych haplotypów (15) do osobników tworzących tę populację (54) oszacowano dla badanych zajęcy na 27%.

Na podstawie analizy wariancji molekularnej AMOVA ustalono rozkład wariancji dla jednego modelu struktury bez podziału na regiony geograficzne (tab.2).

Tabela 2. Wyniki analizy wariancji molekularnej AMOVA, dotyczące struktury genetycznej badanych populacji zajęcy z terenu Polski w oparciu o haplotypy (zidentyfikowane allele). W analizie wykorzystano jeden model struktury bez podziału na regiony*.

Źródła zmienności	Stopnie swobody	Suma kwadratów	Komponenty wariancji	Procentowy rozkład wariancji
Między populacjami	10	6.747	0.03011 V_a	6.84
Wewnątrz populacji	97	39.781	0.41011 V_b	93.16

*Objaśnienia: Prawdopodobieństwo poprawności wyniku $P=0,05$ oszacowane dla 1023 permutacji.

Wyniki analizy wariancji AMOVA wykazały, że tylko 6.84% zmienności znajduje się między populacjami zajęcy, a aż 93.16% zmienności znajduje się wewnątrz populacji. Indeks F_{ST} wyrażający zmienność frekwencji haplotypów pomiędzy analizowanymi populacjami ustalił się na poziomie 0.06840. Co świadczy o niewielkich różnicach genetycznych pomiędzy wszystkimi badanymi populacjami. Wyjątkowo niski poziom zmienności między populacjami świadczy o nieistnieniu regionów geograficznych spowodu, których zajęce mogłyby różnić się genetycznie.

Kolejnym krokiem było wykonanie testu porównania wszystkich 11 populacji między sobą w celu uzyskania macierzy dystansów genetycznych F_{ST} , dzięki czemu można określić różnice genetyczne pomiędzy badanymi populacjami.

Dla każdej porównywanej pary populacji pochodzącej z określonego regionu, została określona wartość F_{ST} , oraz poziom istotności P . W teście przyjęto dopuszczalny poziom istotności równy 0,05 przez co zostały wyeliminowane wartości F_{ST} , które są nie reprezentatywne.

Tabela 3. Macierz standardowych odległości genetycznych F_{ST} dla par populacji.

Populacja	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0.00000								
2	-0.33333		0.00000							
3	0.00000	0.00000		0.00000						
4	-0.10304	-0.07087	0.07058	0.00000						
Ciechanów										
5 Kalisz	0.07458	0.02997	0.01155	0.07731	0.00000					
6	-0.33333	-0.14286	-0.33333	-0.07437	0.07458	0.00000				
7 Łomża	-0.08108	0.07692	0.34426	0.01598	0.21033	-0.08108	0.00000			
8 Oświęcim	-0.16411	-0.04521	0.08197	-0.01299	0.11025	-0.16411	-0.07006	0.00000		
9	0.00000	-0.33333	0.00000	0.00335	0.03350	0.00000	0.34426	0.11921	0.00000	
10 Toruń	0.14505	-0.02096	0.04697	0.09937	0.08501	0.14505	0.27898	0.14693	-0.16728	0.00000
11	0.00000	-0.14286	-0.33333	0.02681	-0.08717	0.00000	0.34426	0.08197	-0.33333	-0.16728

Ostatecznie, na podstawie dopuszczalnego poziomu istotności wyselekcjonowano 7 par porównywanych populacji, które oznaczono czerwoną i brązową czcionką (tab.3). Największy dystans genetyczny dzieli regiony Łomży i Torunia (para 7, 10), jego wartość (kolor czerwony, kolumna 7) wynosi 0,27898 oraz między Łomżą i Kaliszem (para 5 i 7); jego wartość (kolumna 5, kolor czerwony) wyniosła 0,21033. Najmniejszy dystans genetyczny dzieli regiony Ciechanowa i Kalisza (para 4,5); jego wartość wynosi 0,07731 (kolor brązowy, kolumna 4). Jednakże pomimo niewielkich różnic w odległościach genetycznych pomiędzy 7 dostępnymi w teście regionami można uznać, że struktura genetyczna badanych zajęcy na terenie Polski jest podobna.

Ostatnim krokiem badań własnych, było przeprowadzenie testu Hardy'ego-Weinberga w celu porównania obserwowanej heterozygotyczności z heterozygotycznością oczekiwaną.

Tabela 4. Wyniki testu Hardy'ego-Weinberga*

Populacja	Locus	Genotyp	Heterozygotyczność obserwowana	Heterozygotyczność oczekiwana	Poziom istotności (P)	s.d.
Ciechanów	1	12	0.58333	0.85507	0.00089	0.00008
Kalisz	1	13	0.46154	0.83077	0.00331	0.00023
Toruń	1	13	0.53846	0.79077	0.02075	0.00036

*Objaśnienia: Poziom istotności P został ustalony na poziomie 0,05.

Dzięki określeniu wartości poziomu istotności, uzyskano statystycznie poprawne dane dla trzech populacji: Ciechanowa, Kalisza i Torunia (tab.4). Reszta populacji przekroczyła ustalony poziom prawdopodobieństwa poprawności wyników, dlatego pominięto je. We wszystkich trzech wymienionych regionach miast, heterozygotyczność obserwowana była zdecydowanie niższa od oczekiwanej; w przypadku okolic Ciechanowa o 31,7%, Kalisza o 44,4%, a w przypadku Torunia o 31,9% niższa od oczekiwanej.

Dyskusja

W niniejszej pracy przebadano DNA 54 zajęcy pochodzących z 11, arbitralnie wyznaczonych rejonów Polski, niemających związku z geografą kraju, a jedynie z przypadkowym pozyskaniem odłowionych osobników. Niektóre z badanych populacji były nieliczne, jak np. z Białegostoku, Łomży, Chełma, Konina, Świebodzina, Zamościa czy Karkonoszy; składały się bowiem z pojedynczych osobników. Taka sytuacja ma w sposób oczywisty wpływ ograniczający w przypadku ostatecznego wnioskowania. Próby z w/w regionów nie zostały jednak odrzucone z uwagi na ich przydatność w oszacowaniu wskaźnika zmienności V , ale także dlatego, iż traktowane łącznie z osobnikami z innych regionów, poszerzały informację na temat ogólnej liczby haplotypów, alleli oraz heterozygot lub homozygot na terenie całego obszaru badanego.

Dzięki technice SSCP wśród 54 osobników udało się zidentyfikować 15 haplotypów. Średnia wartość wskaźnika zmienności V , która jest wyznaczana stosunkiem procentowym wszystkich uzyskanych haplotypów do osobników tworzących tą populację wynosiła dla badanych zajęcy 27%.

W dostępnej literaturze, najwięcej wyników badań nad genetyką zajęcy pochodzi z Grecji autorstwa m.in. Stamatis i wsp. (2008). Badali oni strukturę genetyczną zajęcy europejskich opierając się na analizie mitochondrialnego DNA. Cenne informacje zawierają także badania przeprowadzone przez Strzałę i wsp. (2008) nad krajową populacją zajęcy. Niektóre fragmenty mitochondrialnego DNA są wyjątkowo polimorficzne i można używać ich do badań filogenetycznych oraz badań nad zmiennością genetyczną. Stamatis i wsp. (2008), stworzyli jedno z pierwszych obszerniejszych zestawień wskaźników zmienności dla zajęcy z krajów europejskich. Dla 926 zajęcy z całej Europy został oszacowany m.in. wskaźnik zmienności V . Wartość V oraz liczebność zajęcy z poszczególnych krajów wynosiła: dla Szwajcarii - 8% (126 zajęcy), Niemiec - 17% (25 zajęcy z północy i 22 z płd. zachodu kraju), Wielkiej Brytanii - 6% (16 zajęcy z północy i 17 z południa kraju), Serbii - 4,5% (22 zające), Chorwacji 37% (11 zajęcy z południa i 5 z północy kraju), Austrii - 6% (121 osobników), Francji - 11,5% (26 zajęcy), Holandii - 20% (10 zajęcy), Hiszpanii - 50% (2 osobniki), Włoch - 25% (4 zające), Polski - 50% (10 osobników), Bułgarii - 58% (108 osobników z 7 regionów kraju), Turcji - 66% (15 osobników), Izraela - 20% (10 zajęcy z północy kraju), Grecji - 33% (376 zajęcy z 10 regionów kraju).

W niniejszej pracy oszacowana wartość V wyniosła 27% dla 54 osobników. Dla porównania, wyniki Strzały i wsp. (2008), dotyczące 370 zajęcy dały wartość $V = 10\%$. Wartość ta nawet nie jest zbliżona do wartości tego wskaźnika uzyskanego dla Polski przez Stamatisa i wsp. (2008), którzy oszacowali ją na poziomie 50% na podstawie badania mtDNA 10 zajęcy. Wydaje się, że wartość V uzyskana przez Greków jest mało wiarygodna, zważywszy na liczbę przebadanych osobników. Ponadto, materiał genetyczny wykorzystany przez Greków, pochodził od zajęcy polskich z lat 80, a przez ten czas populacja zajęcy zmieniała się w czasie razem się środowiskiem Polski (Strzała i wsp., 2008). Wydaje się, że jedynie dane uzyskane dla zajęcy z terenu Niemiec mogą być miarodajne i są zbliżone do wyników wskaźnika V , oszacowanego w niniejszej pracy, bowiem greccy badacze oszacowali wskaźnik V dla Niemiec na poziomie 17%, przebadawszy łącznie 47 zajęcy. Dla badaczy polskich wskaźnik V zajęcy niemieckich jest o tyle istotny, iż Niemcy to kraj, na pograniczu, którego zające polskie wymieniają geny z populacją zajęcy niemieckich.

Stamatis i wsp., (2008), określili także za pomocą analizy molekularnej AMOVA udział zmienności między populacjami do całkowitej zmienności populacji zajęcy europejskich, która wyniosła 50%. W obecnej pracy główny rodzaj zmienności stanowiła zmienność wewnątrz populacji i wynosiła 93,16%. Podobne wynik uzyskał Strzała i wsp., (2008), który na podstawie 370 przebadanych zajęcy oszacował tę wartość na 92%. Sugeruje to, że struktura populacji zajęcy polskich dosyć znacznie różni się od populacji europejskiej.

Na podstawie badań własnych ustalono, że udział zmienności między populacjami w całkowitej zmienności genetycznej wynosi zaledwie 6,84%. Można zatem przypuszczać, że poszczególne populacje z 11 przebadanych regionów nie wykazują szczególnych cech genetycznych odróżniających je od zajęcy z innych populacji. W badaniach Strzały i wsp., (2008), wartość zmienności między populacjami wyniosła także niewiele - 7,82%. Świadczy to bardzo równomiernym rozproszeniu zmienności genetycznej zajęcy w Polsce.

Analogiczne badania to niniejszej pracy przeprowadzili Koutsogiannouli i wsp. (2009), nad exonem 2 genu DQA. Przeanalizowali oni strukturę genetyczną 670 zajęcy, z czego połowę stanowiły zające z Grecji, zaś resztę zające z 9 innych krajów europejskich. Gen DQA jest „sąsiadem” locus DR w obrębie haplotypu MHC klasy II ssaków. Stanowi zapis informacji dla ekspresji domeny alfa 1 cząsteczki MHC klasy II. Jego znaczenie i funkcja w komórkach ssaków jest kluczowa (podobnie jak genu DRB)

dla inicjacji reakcji odpornościowej. W większość populacji przebadanych przez greckich naukowców, heterozygotyczność obserwowana była niższa od oczekiwanej. W obecnej pracy w każdej z trzech statystycznie istotnych populacji, heterozygotyczność obserwowana była, co najmniej w 31,7% niższa od oczekiwanej. Można to uzasadnić ogólnym zmniejszaniem się populacji zajęcy w Europie i zbyt często występującym w związku z tym chowem krewniaczym oraz efektami selekcji naturalnej, która także ujednolica genotypy. Skutki takiej sytuacji bywają często niekorzystne (choć nie zawsze), ponieważ homozygotyczny układ MHC koduje cząsteczki zarówno klasy I jak i II prezentujące bardziej ograniczony zestaw antygenów niż heterozygoty, a to z kolei bezpośrednio przekłada się na zmniejszenie możliwości adaptacyjnych osobnika. Jednakże czasem, w szczególnej sytuacji np. epidemii, homozygotyczny układ genów MHC lepiej prezentuje groźny antygen wywołujący schorzenie i w konsekwencji epidemię, niż genotyp heterozygotyczny. Homozygoty przeżywając, przekazują wszystkim swoim potomkom identyczne haplotypy, w efekcie pojawia się w populacji znaczna homozygotyczność, która jest pokłosiem epidemii.

Podsumowanie

W badaniach własnych na podstawie DNA uzyskanego od 54 zajęcy z 11 regionów Polski, określono polimorfizm exonu 2 genu DRB MHC klasy II zajęcy. Ostatecznie 54 produkty PCR zostały poddane analizie SSCP w celu określenia haplotypów badanych osobników. Haplotypy uwidaczniano na żelu poliakryloamidowym za pomocą azotanu srebra. Zidentyfikowano łącznie 12 alleli, które tworzyły 15 różnych haplotypów. Za pomocą programu komputerowego Arlequin poddano uzyskane dane analizom statystycznym AMOVA: tworzeniu macierzy odległości genetycznych F_{ST} oraz testowi Hardy'ego-Weinberga. Ustalono obraz matematyczny struktury genetycznej będący podstawą do wnioskowania o strukturze genetycznej badanych regionów oraz całej krajowej populacji zajęcy szaraka. Na podstawie testu AMOVA stwierdzono brak istotnej zmienności genetycznej pomiędzy badanymi populacjami, która wynosiła jedynie 6.84%. Resztę stanowiła zmienność obecna wewnątrz populacji. Udało się określić macierz odległości genetycznych dla 7 regionów (z pominięciem regionów, które z powodu małej liczby prób były niereprezentatywne). Wykazano niewielkie odległości genetyczne pomiędzy badanymi populacjami, co dowodzi jednolitej struktury genetycznej populacji zajęcy w Polsce oraz wyklucza istnienie odrębnych genetycznie regionów. Program Arlequin ustalił porównanie heterozygotyczności obserwowanej do oczekiwanej, które było w każdym z trzech istotnych przypadków niższe od oczekiwanego (co najmniej 31,7% w każdym przypadku). Może to świadczyć o pewnych naturalnych zjawiskach zachodzących w populacji zajęcy, takich jak chów krewniczy w małych populacjach, lub silna presja środowiska wywołana epidemią. Praca stanowi początek dla badań, które powinny być przeprowadzane na większą skalę.

Wnioski

1. W badaniach wykazano, iż polimorfizmy związane z *locus* eksonu 2 genu DRB1 są równomiernie rozproszone w badanych regionach Polski.
2. Oszacowana znacząca zmienność genetyczna wewnątrz populacji zajęcy w Polsce, jest pozytywną informacją, bowiem teoretycznie umożliwia jej odrodzenie liczebne, przy zastosowaniu jednak pewnych niezbędnych warunków, jak np. zaniechanie odłowu zajęcy na wiele lat oraz przygotowanie nowych siedlisk, zgodnie np. z planami NATURA 2000.
3. W regionach, w których stwierdzono obniżenie poziomu heterozygotyczności, należy monitorować populację pod względem badanych w niniejszej pracy *loci*, by śledzić zmiany struktury genetycznej populacji w następnych pokoleniach zajęcy.

Piśmiennictwo

- Bergstroöm**, T.F., Erlandsson, R., Engkvist, H., Josefsson, A., Erlich, H.A., Gyllensten, U. (1999). Phylogenetic history of hominoid DRB loci and alleles inferred from intron sequences. *Immunol Rev* 167:351–365
- Capucci**, L., Scicluna, M. T., Lavazza, A. (1991). Diagnosis of viral hemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Revue Scientifique et Technique. Office International des Epizooties* 10: 347–370.
- Djan** M., Obreht D., Vapa L. (2006). Polymorphism of mtDNA regions in brown hare (*Lepus europaeus*) populations from Vojvodina (Serbia and Montenegro). *Eur J Wildl Res* (2006) 52: 288–291.
- Homolka**, M., Zima, J. (1999). *Lepus europaeus*. w A.J. Mitchell-: Jones, G. Amori, W. Bogdanowicz, B. Kryštufek, P.J.H. Reijnders, F. Spitzenberger, M. Stubbe, J.B.M. Thissen, V. Vohralík, and J. Zima, *The Atlas of European Mammals*. Academic Press, London. 166–167.
- Koutsogiannouli**, E. A., Moutou, K. A., Sarafidou, T., Stamatis, C., Spyrou†, V., Mamuris, Z., (2009). Major histocompatibility complex variation at class II DQA locus in the brown hare (*Lepus europaeus*) *Molecular Ecology*, 18, 4631–4649
- Mamuris**, Z., Sfougaris, A.I., Stamatis, C. (2001). Genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations as revealed by mtDNA RFLP-PCR analysis: implications for conserving genetic diversity; *Biological Conservation* 101 (2001) 187-196.
- Nyenhuis**, H. (1998). Verteilung und Dichte des Feldhasen (*Lepus europaeus* P.) analysiert nach dem Einfluss der Bodennutzung in Nordwestdeutschland. *Allg. Forst-u.J.-Ztg.* 170.Jg (2): 28–33.

- Nowaczyk, P., Deptuła, W.** (2007). Odporność nieswoista u królików eksperymentalnie zakażonych wirusem EBHS. *Medycyna Wet.* 2007, 63 (6). 727-730.
- Nowotny N., Bascunana C. R., Ballagi-Pordany A., Gavier-Widen D., Uhlen M., Belak S.** (1997). Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses by comparison of sequences from the capsid protein gene. *Arch. Virol.* 142, 657-673.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanashi, H., and, Sekiya, T.** (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2766–2770.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K.** (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5, 874–879.
- Reichlin, T., Klansek, E. i wsp.** (2006). Diet selection by hares (*Lepus europaeus*) in arable land and its implications for habitat management. *European Journal of Wildlife Research* 52 (2):109-118.
- Qian, W., Xiaobing, W., Peng, Y., Shuai, Z.** (2008). Sequence variability analysis on major histocompatibility. *Front. Biol. China* 2008, 3(1): 55–62.
- Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L.** (2006). ARLEQUIN, Version 3.1 Software for Population Genetic Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- Sert, H., Suchentrunk, F. & Erdog n, A.** (2005). Genetic diversity within Anatolian brown hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) and differentiation among Anatolian and European populations. *Mammalian Biology*, 70, 171–186.

Strandgaard, H., Asferg, T. (1980). The Danish Bag Record II. Fluctuations and trends in the Game bag record in the years 1941-1976 and the geographical distribution of the bag in 1976. *Danish Rev. Game Biol.* 11, 32-33.

Stamatis, C., Suchentrunk, F., Moutou, K., Giacometti, M., Haerer, G., Djan, M., Vapa, L., Vukovic, M., Tvrtković, N., Sert, H., Alves, P., Mamuris, Z. (2008). Phylogeography of the Brown hare (*Lepus europaeus*, Pallas 1778) in Europe: a legacy of southeastern Mediterranean refugia? *Journal of Biogeography*, Rozdział 36, 515 - 528.

Strzała, T., Stamatis, C., Kosowska, B., Moska, M., Marszałek-Kruk, B., Mamuris, Z. (2008). Genetic variability of the Polish brown hare (*Lepus europaeus*) based on PCR-RFLP mtDNA Analysis, *EJPAU 1 Medicina Veterinaria* 1 (1). 46-51.

Suchentrunk, F., Michailov, C., Markov, G. & Haiden, A. (2000). Population genetics of Bulgarian brown hares *Lepus europaeus*: allozymic diversity at zoogeographical crossroads. *Acta Theriologica*, 45, 1-12.

Tapper, S.C., Parsons, N., (1984). The changing status of the Brown hare (*Lepus capensis* L.) in Britain. *Mammal Rev.* 14, 57-70.

Titus-Trachtenberg, E. A. Rickards, O., De Steano, G. F., Erlich, H. A. (1994). Analysis of HLA class II haplotypes in the Cayapa Indians of Ecuador: a novel DRB1 allele reveals evidence for convergent evolution and balancing selection. *Am J Hum Genet* 55: 60–167.

Vapa, L., Obreht, D., Vapa, M., Selmic, V. (2002). Genetic variability in Brown Hare (*Lepus europeus*) populations in Yugoslavia. *Z. Jagdwiss.* 48 (2002), Supplement, 261 – 266.

Dzieła zwarte

Almasan, H., Cazacu, I. (1976). Der Hase in der Sozialistischen Republik Rumänien. Ecology and management of European hare populations. Warszawa, PWRiL. s.29-31.

Dziedzic, R. R., Kamieniarz, B., Dziedzic, M. Wójcik, Beeger, S., Flis, M., Olszak, K., M. Żontała (2000). Przyczyny spadku populacji zająca szaraka w Polsce. Wydawnictwo Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie 2000. s.53-60.

Dziedzic, R., Dzieciotłowski, R., Bresiniński, W., Wasilewski, M., Flis, M., Wójcik, M., Beeger, S., Olszak, K., Czyżowski, P., Przypaśniak, J., Wawrzyniak, P. (2000). Charakterystyka populacji zająca w wybranych obszarach Polski w latach 1997–1999. Mat. Konf. "Zwierzyna drobna jako elementy bioróżnorodności środowiska przyrodniczego". Włocławek. Oficyna Wyd. WTN. s. 63.

Flux, J.E.C., Angermann, R. (1990). The hares and jackrabbits. In: Chapman, J.A., Flux, J.E.C. (Eds.), Rabbits, Hares and Pikas. Status Survey and Conservation Action Plan, 4. IUCN/SSC Lagomorph Specialist Group, Gland, Switzerland, s. 61–94.

Jakóbisiak, M., Płoski, R. (2007). Immunologia, PWN rozdz. 7, s.61-69

Nowak, Z., Gruszczyńska, J., (2007) Wybrane techniki i metody analizy DNA, Wydawnictwo SGGW Warszawa. s. 26-29, 59-60.

Pielowski, Z., Raczyński, J. (1976). Ecological Conditions and Rational Management of Hare Populations. w: Ecology and management of European hare populations. PWRiL.Warszawa. s. 269-286.

Pfister, H.P., Kohli, L., Kästli, P., Birrer, S. (2002). Feldhase. Schlussbericht 1991–2000. Schriftenreihe Umwelt, vol. 334. Wyd. BUWAL, Berno, s.150.

Salzmann-Wandeler, I. (1976). Feldhasen-Abschusszahlen in der Schweiz. Ecology and management of European hare populations. PWRiL.Warszawa. s. 35-40.

Źródła internetowe

Dessen, P., Le Minor, S. (2010). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_HLA-DRB1.html